

Recursos Genéticos y Genómicos para Mejorar la Calidad del Fruto en Tomate

Rodríguez GR¹, Pereira da Costa JH¹, Pratta GR¹, Zorzoli R² y Picardi LA²

Cátedra de Genética, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario.

¹CONICET. ²CIUNR.

El fruto de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una fuente esencial de nutrientes para la dieta humana por su contenido en licopeno, flavonoides, vitamina C, minerales y fibras. Por su gran aceptación como alimento y versatilidad en la elaboración de comidas, es una de las hortalizas que más se consume en nuestro país con un promedio de 16,0 Kg/habitante/año, siendo este valor superior al consumo promedio mundial estimado en 5,6 Kg/habitante/año. A nivel mundial es el 16° cultivo más importante por su producción en toneladas y el 7° por los ingresos que genera¹.

El tomate es diploide en su constitución genética, con un número básico de 12 cromosomas, un genoma de tamaño pequeño y un corto ciclo de cultivo que, sumados a la disponibilidad de herramientas genómicas y genéticas, lo convierten en uno de los modelos genéticos más efectivos para el mejoramiento de los cultivos².

Se conocen 13 especies de tomate, 12 silvestres entre ellas *S. pimpinellifolium* (Figura 1A) y una especie cultivada. Todas son diploides con igual número de cromosomas³. Las especies silvestres crecen como maleza en su centro de origen, definido por la región Andina de América del Sur comprendida entre Ecuador y el norte de Chile. El tomate fue domesticado por las culturas precolombinas en Perú o en la región de la península de Yucatán en México^{4,5}. La domesticación ha ocurrido en dos etapas. La primera etapa fue la selección de frutos de tamaño moderado, tipo *cherry* (Figura 1B), con la fijación de la autogamia o la producción de semillas por autofecundación, en el mismo centro de origen; y en la segunda se produjo la transferencia desde los Andes hacia América Central con la selección de frutos de tamaño mayor⁶. Después del descubrimiento de América, el tomate fue llevado a Europa desde donde se dispersó al resto del mundo. Los cambios más importantes que ocurrieron durante el proceso de domesticación y la historia reciente de mejoramiento del cultivo fueron: el sistema de reproducción desde la alogamia (fecundación cruzada) a la autogamia, el incremento del tamaño del fruto, la obtención de formas y colores del fruto muy variadas y la uniformidad en la coloración de los frutos maduros^{7,8,9,10}. Los distintos procesos migratorios durante la domesticación y el mejoramiento del cultivo han provocado cuellos de botella que redujeron la variabilidad genética existente en el germoplasma cultivado^{11,12}. Se estima que, menos del 5% de la variabilidad genética total está presente en el tomate cultivado¹³, y por ello, las actuales poblaciones de mejora presentan un techo potencial tanto para incrementar el rendimiento como la calidad de los frutos¹⁴.

Gur & Zamir¹⁵ sostienen que la biodiversidad presente en el tomate silvestre es una fuente subexplotada que puede enriquecer las bases genéticas del cultivo con alternativas génicas que mejoren la productividad, calidad y/o la adaptación. Las especies silvestres de tomate aportaron resistencias a insectos, enfermedades y a condiciones ambientales adversas tales como sequía y/o salinidad en los programas de mejoramiento¹⁶. Sin embargo, estas especies también presentan variabilidad para las características de calidad de los frutos tales como son el sabor, el aroma, la

coloración y la textura, dado que en sus hábitats nativos los harían más atractivos a los predadores que dispersan su semilla.

La semilla mejorada genéticamente es el principal vehículo de agregación de valor en productos primarios agrícolas. Sin embargo, Argentina posee un perfil netamente importador de semillas hortícolas, especialmente para tomate. Las semillas importadas, aunque satisfacen el rendimiento buscado por los productores locales carecen de la calidad requerida por los consumidores y son materiales que fueron desarrollados para otros ambientes y condiciones de cultivo. En Argentina se siembran 16.000 hectáreas/año con una producción total de 0,7 millones de toneladas¹. Se industrializa entre el 35 y el 40 % de la producción y el principal destino es para consumo en fresco. Ahora bien, el fruto de tomate es altamente perecedero y cualquier intento de prolongar su vida poscosecha favorece la comercialización y disminuye las pérdidas poscosecha estimadas en aproximadamente el 50 % de lo producido en países en desarrollo¹⁷. Hasta el momento, el mejoramiento genético para prolongar la vida poscosecha se ha hecho a través de la incorporación de genes presentes en el germoplasma del tomate cultivado tales como el *rin* (*ripening inhibitor*) y el *nor* (*non ripening*) que en condición híbrida o heterocigota modifican vías metabólicas prolongando el periodo de maduración del fruto pero disminuyendo su calidad (Figura 1E). Una alternativa para superar estas dificultades es incorporar genes de larga vida poscosecha provenientes de las especies silvestres de tomate, lo que permite mejorar simultáneamente otros atributos de calidad^{18,19,20}.

El uso de cruzamientos interespecíficos en tomate (cultivado x silvestre) presenta ventajas biológicas y tecnológicas. Dentro de las primeras, las especies silvestres tienen alternativas genéticas que mejoran la calidad del fruto. Por ejemplo, la línea LA722 de *S. pimpinellifolium* prolonga la vida poscosecha de los frutos cuando una región del cromosoma 8 o del 10 es incorporada por cruzamiento al cultivar argentino Caimanta²¹. Con respecto a las ventajas tecnológicas el gran polimorfismo molecular (diferencias a nivel de las secuencias del material genético o ADN) entre los genotipos progenitores del cruzamiento, permite localizar muchos marcadores moleculares en las regiones del genoma que controlan las diferencias morfológicas, bioquímicas o productivas. Un marcador molecular de ADN es una diferencia o polimorfismo en la secuencia del genoma que puede detectarse mediante tecnologías apropiadas y que indica que próximo a él se encuentra un gen de interés. Como el marcador molecular y el gen que controla el carácter de interés (y que no conocemos) están ligados o muy cercanos en el genoma, estos preferentemente se heredan juntos. Una vez que se determinó que el marcador está ligado o próximo a un gen de interés se practica selección indirecta del carácter a través del marcador. La herencia de los atributos morfológicos, productivos, nutricionales y organolépticos de los frutos en tomate es compleja debido a su naturaleza cuantitativa (controlada por muchos genes). Sin embargo, con el advenimiento de los marcadores moleculares, la mayor proporción de la variación observada para un carácter en el germoplasma puede ser explicada por un número relativamente bajo de regiones genómicas o *loci*²². Según Tanksley et al.²³, los marcadores moleculares de ADN permiten estimar con precisión la localización de los *loci* que controlan el carácter de interés en los cromosomas de la especie, así como también el número y magnitud de sus efectos.

La secuenciación de un genoma es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en el ADN o material hereditario a lo largo de cada cromosoma de la especie. Un proyecto de secuenciación genómico se realiza en una sola línea o genotipo que actúa como referencia. El

Proyecto Genoma Tomate se hizo con el cultivar Heinz 1706 (Figura 1D). El genoma de tomate tiene un tamaño de 900 Mb (900.000.000 bases o nucleótidos), de los que se han podido alinear en sus 12 cromosomas ~760 Mb (Figura 2A). La comparación de los genomas de Heinz 1706 y la línea LA1589 de *S. pimpinellifolium* evidenció que estas dos especies divergen sólo en un 0,6% en la secuencia de nucleótidos²⁴. No obstante, esta pequeña diferencia se debe a ~5 millones de cambios en un único nucleótido (*SNP*, *Single Nucleotide Polymorphism*) y más de 9000 polimorfismos del tipo INDEL (INserción/DELección, que es la ganancia o pérdida de un pequeño fragmento de ADN en el material genético). En la figura 2B se muestra un cambio de nucleótido desde A a G localizado en el primer tercio de la secuencia del cromosoma 1; mientras que en la Figura 2A se detalla el número de INDELs por cromosoma y en la Figura 2C un INDEL localizado en el extremo distal del cromosoma 1. Tanto los *SNPs* como los INDELs están distribuidos a lo largo de los 12 cromosomas y los convierte en potenciales marcadores moleculares para su uso en el mejoramiento genético del cultivo.

Este avance sobre el conocimiento del genoma será aplicado en el programa de mejoramiento de tomate que tiene la Cátedra de Genética de la FCA-UNR en el que se han obtenido y evaluado materiales genéticos obtenidos de cruzar el cultivar argentino Caimanta con un genotipo de *S. pimpinellifolium*. El cultivar Caimanta es de tipo “platense” con frutos grandes y con buenas características organolépticas pero que presenta una vida poscosecha muy corta (Figura 1C). La línea LA722 de *S. pimpinellifolium* presenta frutos chicos, redondos, de alta calidad organoléptica y con una vida poscosecha prolongada (Figura 1A). Varias poblaciones genéticas se han obtenido y se continúan desarrollando a partir del mencionado cruzamiento interespecífico tales como: F_2 , *RILs* (*Recombinant Inbreed Lines* o Líneas endocriadas recombinantes), HSC, (Híbridos de Segundo Ciclo) y *NILs* (*Near Isogenic Lines* o líneas casi isogénicas). Estas poblaciones y el proceso de desarrollo se detallan en la Figura 3. La población F_2 se originó de la autofecundación del híbrido entre ambos progenitores. A partir de esta población se comenzó un proceso de selección para el peso y la vida poscosecha hasta obtener líneas luego de siete generaciones de autofecundación (*RILs*). Las *RILs*, son líneas homocigotas, que tienen en su constitución genética fragmentos recombinados al azar del genoma de ambos progenitores a lo largo de los 12 pares de cromosomas. Las 18 *RILs* presentan variabilidad genética para el peso, la vida poscosecha, la acidez, la firmeza, y el contenido de azúcares en los frutos. Los híbridos entre algunas de estas líneas recombinantes (HSC) tienen mejor comportamiento para algunos caracteres de calidad del fruto en tomate y las generaciones segregantes derivadas de estos HSC, muestran nuevas variantes genéticas debido a la recombinación de los genes (Figura 3). Por otro lado, las plantas de la generación F_1 fueron cruzadas manualmente hacia Caimanta para obtener la primera retrocruza (R_1), luego plantas de la primera retrocruza fueron cruzadas por Caimanta para obtener la segunda retrocruza (R_2) y se siguió con este proceso hasta la generación R_4 . Luego de cuatro retrocruzas hacia el padre recurrente Caimanta, se espera obtener una población de *NILs*. Una *NIL* es una línea que es idéntica en su genotipo al progenitor Caimanta pero difiere en una única región genómica que tiene su origen en el genotipo silvestre. En este caso las diferencias observables entre la *NIL* y el cultivar Caimanta se deberán exclusivamente a la región introgresada desde la especie donante o silvestre. Estas poblaciones generadas por la Cátedra de Genética constituyen recursos genéticos sumamente valiosos para estudiar las bases genéticas que definen caracteres de importancia agronómica tales como son el peso, la vida poscosecha, el color, el sabor y la textura de los frutos en tomate.

Para estudiar las bases genéticas que controlan caracteres de interés agronómico en estos recursos genéticos, se utilizarán además de 30 marcadores SSR (*Single Sequence Repeats*) que ya fueron puesto a punto en la Cátedra de Genética FCA-UNR²¹, marcadores tipo INDEL (Figura 2C) que están disponibles en la página web de Solanáceas (<http://solgenomics.net/oldhighlights.pl>). En la figura 2D se muestra un gel de agarosa en el que observa el polimorfismo para una delección de 25 nucleótidos en los genotipos de *S. pimpinellifolium* (banda más liviana o inferior de 121 nucleótidos) y la inserción de 25 nucleótidos en los genotipos cultivados (banda más pesada o superior de 146 nucleótidos).

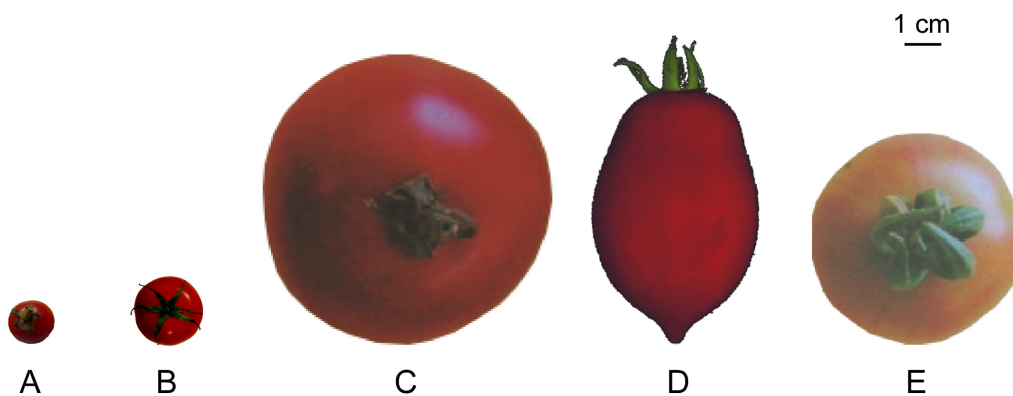
En resumen, los cruzamientos interespecíficos son ideales para estudiar las bases moleculares que rigen los caracteres de calidad del fruto en tomate. Esto se debe al elevado polimorfismo existente, capaz de localizar un alto número de marcadores moleculares en las regiones de interés que controlan los caracteres de interés; pero fundamentalmente porque las especies silvestres (como uno de los progenitores del cruzamiento) no han sido suficientemente exploradas en su aporte para mejorar las características de calidad del fruto. Los estudios experimentales que se realizan en la Cátedra de Genética de la FCA-UNR aportan conocimiento básico sobre las modificaciones en la estructura genómica del tomate cultivado causadas por la incorporación del germoplasma silvestre y los cambios fenotípicos asociados, que serán el sustento para la generación de nuevos materiales genéticos que satisfagan la demanda de los productores y los consumidores y que estén adaptados al ambiente y las formas de cultivo que se practican en el área de influencia de nuestra Institución.

Referencias Bibliográficas















1. FAO. Base de datos Estadísticos 2010. FAOSTAT. <http://faostat.fao.org>
2. Giovannoni J (2004). Plant Cell 16, 170–180
3. Peralta I, et al. (2008). Science. Vol. 113, p. 192
4. Candolle AD (1886). Paris, F. Alcan
5. Jenkins JA (1948). Economic Botany 2, 379-92
6. Ranc N, et al. (2008). BMC Plant Biology 8, 130
7. Chen KY, et al. (2007). Science 318, 643–5
8. Paran I & Van der Knaap E (2007). Journal Experimental Botany 58, 3841–52
9. Powell ALT, et al. (2012). Science 336, 1711–5
10. Rodríguez GR, et al. (2011). Plant Physiology 156, 275–85
11. Rick C & Fobes J (1975). Bulletin of the Torrey Botanical Club 102, 376–84
12. Warnock SJ (1988). HortScience 23, 669-73
13. Miller J & Tanksley SD (1990). Theoretical and Applied Genetics 80, 437–48
14. Grandillo S, et al. (1999). Euphytica 110, 85–97.
15. Gur A & Zamir D (2004). PLoS Biology 2, e245
16. Rick CM & Chetelat RT (1995). Acta Horticultura 412, 21-38
17. Meli V, et al. (2010). Proceedings of the National Academy of Sciences 107, 2413–8
18. Pratta GR, et al. (1996). Horticultura Argentina 15, 25-32
19. Zorzoli R, et al. (1998). Mendeliana 13, 12-19
20. Rodríguez GR, et al. (2010). Euphytica 176, 137–47
21. Pereira da Costa JH, et al. (2013). Scientia Horticulturae (en prensa)
22. Paterson AH, et al. (1988). Nature 335, 721–26
23. Tanksley SD, et al. (1992). Genetics 132, 1141–60

24. The Tomato Genome Consortium (2012). Nature 485, 635–41

Figura 1. Frutos representativos de especies silvestres y cultivares de tomate (*S. lycopersicum*). A- LA722 de *S. pimpinellifolium*. B- LA1385 de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (tomate *cherry*). C- cultivar Caimanta. D- cultivar Heinz 1706. E- cultivar 804620 portador de los alelos de larga vida en el gen *NOR*.



A

Cromosoma	Sequencia lineal de cada cromosoma de tomate	Tamaño en nucleótidos (bp)	INDELs Predichos ¹
12		65.486.253	4.768
11		53.386.025	524
10		67.662.091	525
9		64.834.305	475
8		63.032.657	377
7		65.268.621	412
6		46.041.636	472
5		65.021.438	482
4		64.064.312	383
3		64.840.714	381
2		49.918.294	339
1		90.304.244	322
	 	$\Sigma =$ 759.860.590 pb 759.86 Mb 0.76 Gb	9.460

B SNP o polimorfismo de base única entre las secuencias de *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* en la posición 2.748.235 del cromosoma 1

Secuencia de *S. lycopersicum* AAACGGCAAAAACTTGACGTATT
 Secuencia de *S. pimpinellifolium* AAACGGCAAAAGACTTGACGTATT

C INDEL entre las secuencias de *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* en la posición 90.037.147 del cromosoma 1

Seuencia de *S. lycopersicum*
Seuencia de *S. pimpinellifolium*

Delección de 25 nucleótidos en *S. pimpinellifolium*

>>>> Cebadores o *primers* desarrollados para amplificar la secuencia que contiene el INDEL

D Gel de agarosa (3%) en el que se pueden distinguir los diferentes alelos de los materiales genéticos por su peso para el INDEL ejemplificado en C.

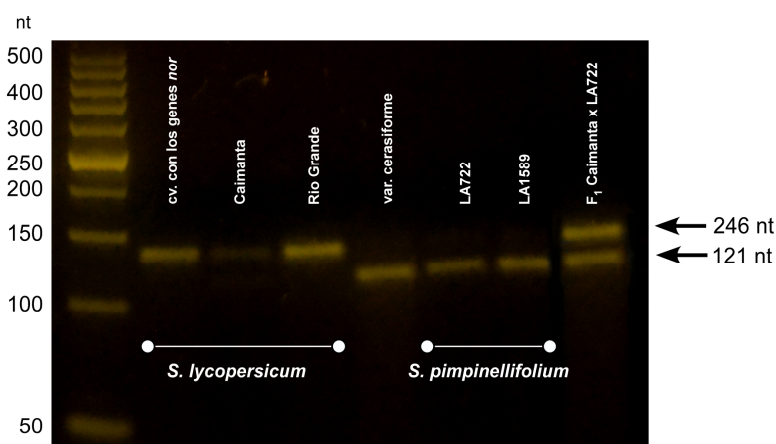


Figura 3. Recursos genéticos generados por la Cátedra de Genética FCA-UNR a partir del cruzamiento entre el cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* y la línea LA722 de *S. pimpinellifolium*.

